

# 反相高效液相色谱法检测降血压肽

曲运波 李娟<sup>a</sup> 庞思平

(北京理工大学生命科学与技术学院 北京市海淀区中关村南大街5号 100081)

<sup>a</sup>(山西省潞城一中 山西省潞城市 030860)

**摘 要** 实验研究并建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法检测降血压肽。结果表明: 在选定的实验条件下, 降血压肽浓度与抑制率呈良好的线性关系, 校准曲线的相关系数为 0.9936, 测定的平均回收率 98.6%—102.3%, 相对标准偏差为 2.63%, 该方法简便、快速、准确、灵敏, 可用于检测降血压肽。

**关键词** 降血压肽, 反相高效液相色谱。

中图分类号: O 657.7<sup>+</sup>2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2008)02-0081-03

## 1 引言

降血压肽是一类血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI), 它通过抑制血管紧张素转换酶(ACE)的活性而达到降压的作用, 因此可测定降血压肽对ACE活性的抑制率来反映它降压活性的大小<sup>[1,2]</sup>。目前, 检测降血压肽的方法主要是免疫放射法、紫外分光光度法<sup>[3]</sup>, 但这两种方法存在实验步骤繁琐, 检测时间较长, 对实验操作要求甚高, 实验易产生误差等缺点, 因此, 建立一种有效、简便的检测方法尤为迫切。本实验尝试用反相高效液相色谱法检测降血压肽。

## 2 实验原理

ACE催化分解血管紧张素I的模拟物马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL), 产生马尿酸, 当加入降血压肽时, ACE对HHL的催化分解作用受到抑制, 马尿酸的生成量减少。在反相高效液相色谱洗脱图谱中, 马尿酸的洗脱峰的峰面积与马尿酸的量呈很好的线性关系, 因此可通过测定加入降血压肽前后马尿酸峰面积的差别即可反映它降压活性的大小。

## 3 实验材料与方法

### 3.1 实验材料

Waters 2690 高效液相色谱仪, Waters 996 检测器(美国Waters公司), UV-2201 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), 降血压肽MRWRD: 用超纯水MRWRD(美国肽公司)配制成  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的储备液, 使用时逐渐稀释成所需要浓度, ACE液: 取1个单位ACE(美国Sigma公司)溶于 5mL 0.05mol/L 硼酸盐缓冲液(pH=8.3),  $5 \times 10^{-6}$  mol/L 马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)液: 称取 28mg HHL(美国Aldrich公司)溶解在 5mL 0.1mol/L 含 0.3mol/L 氯化钠的硼酸盐缓冲液中(pH=8.3)。

联系人, 电话: (010)68914504(办); E-mail: qyb@bit.edu.cn

作者简介: 曲运波(1970—), 男, 山西省运城市人, 实验师, 从事生物化学工作。

收稿日期: 2007-09-26; 接受日期: 2007-10-17

### 3.2 实验方法

在 37 反应体系中依次加入 80 $\mu$ L HHL 液、降血压肽 MRWRD 液、超纯水,每次测试的总体积为 0.2 mL,把以上混合液放入 37 恒温水浴中保温 3 min,然后加入一定量的 ACE 酶液(10 $\mu$ L)启动反应,恒温保持 30 min 后,加入 0.2 mL 1 mol/L HCl 中止反应,至室温取 5 $\mu$ L 反应产物进样,通过反相高效液相色谱洗脱图谱定量。通过 HPLC 洗脱图谱定量马尿酸的生成量,从而计算降血压肽的抑制率。其中,抑制率(%) =  $(A_1 - A_2) / A_1$ ,  $A_1$ ——不存在降血压肽时的峰面积,  $A_2$ ——存在降血压肽与酶时的峰面积,对 ACE 抑制率为 50% 时的降血压肽浓度即为半抑制浓度。

### 3.3 色谱条件

高压液相色谱系统: WATERS 2690, 检测器: Waters 996, 色谱柱: ZORBAX ODS 4.6  $\times$  150 mm, 洗脱液: 30% 甲醇: 70% 水(含 1% HAC), 洗脱液流速: 1 mL/min, 检测波长: 229 nm, 进样量: 5 $\mu$ L。

## 4 结果与讨论

### 4.1 检测波长的选择

取标准马尿酸溶液在 200—300 nm 范围进行紫外光谱扫描,扫描图谱见图 1 所示。结果表明: 标准马尿酸样品在 229 nm 有最大吸收,故选择 229 nm 作为检测波长。

### 4.2 RP-HPLC 法回归方程

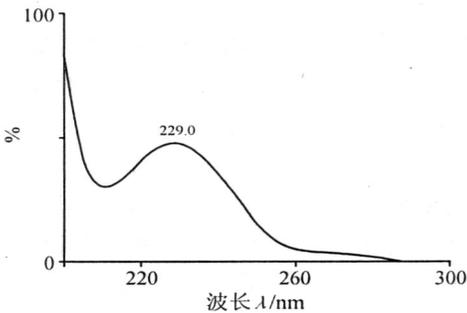


图 1 马尿酸的紫外扫描光谱图

RP-HPLC 是利用反应产物中各组分的极性不同而进行分离的。由图 2 可以看出马尿酸与反应产物中其他组分的洗脱峰能很好地分开,因此采用 RP-HPLC 可以准确测定马尿酸的量。这是 RP-HPLC 检测降血压肽的依据。

把上述标准样品按照反相高效液相色谱条件进行测定。以峰面积( $y$ )为纵坐标对横坐标 ACE 抑制剂浓度( $x$ )进行线性回归。绘制校准曲线图(见图 3)并推导其回归方程,其方程为  $y = 52.383x + 35.876$ ,  $r^2$  为 0.9936。

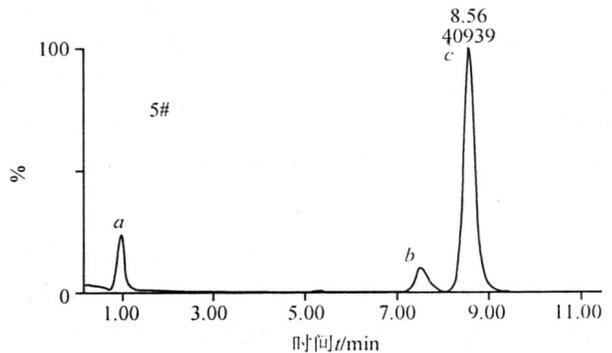


图 2 反应后的色谱图

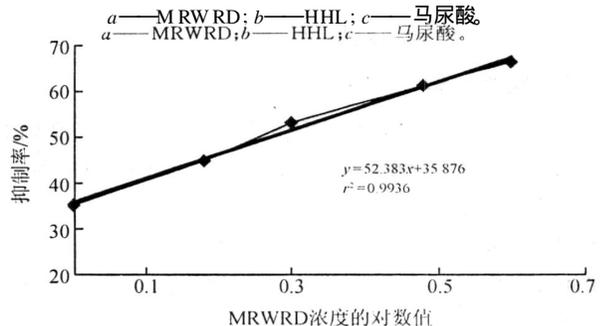


图 3 不同浓度 MRWRD 对 ACE 的影响

### 4.3 精密度与重复性试验

按上述检测方法, 将同一样品重复检测 5 次, 测定结果如表 1。马尿酸的平均含量为 193.09ng, 相对标准偏差为 2.63%, 具有良好的重现性和精密度。

表 1 分析方法的精密度

序号	峰面积	马尿酸 (ng)
1	277845	188.96
2	279833	190.33
3	278281	189.27
4	288963	196.54
5	294569	200.35
平均值		193.09
相对标准偏差 (%)		2.63

### 4.4 加标回收实验

按上述方法, 将同一样品反应 30min (平行 3 份), 然后在其中加入 51.96ng 马尿酸, 按 RP-HPLC 法分别测其马尿酸的含量, 其平均回收率 98.6%—102.3% (见表 2), 表明该方法的准确度良好。

表 2 回收率实验结果

序号	样品中马尿酸 (ng)	加入的马尿酸 (ng)	测得总值 (ng)	回收率 (%)
1	120.11	51.96	171.28	99.5
2	120.11	51.96	169.70	98.6
3	120.11	51.96	175.99	102.3

## 5 结论

(1) 实验建立了一种测定降血压肽的新方法。样品中的 ACE 抑制活性的计算公式如下: ACE 活性抑制率 (%) =  $(A_1 - A_2) / A_1$ ; 其中  $A_1$ ——不存在降血压肽时的峰面积;  $A_2$ ——存在降血压肽与酶时的峰面积。

(2) 该新方法准确度高, 检测所需要的时间较短, 能准确地反映降血压肽的活性, 克服了以前测定方法的缺陷, 适合于降血压肽的快速筛选。

## 参考文献

[1] Yosipiv IV. Developmental Biology of Angiotensin-Converting Enzyme[J]. *Pediatr Nephrol*, 1998, **12**: 72—79.  
 [2] 王海燕, 张佳程. 乳源 ACE 抑制剂 (降血压肽) 的研究现状[J]. *食品与发酵工业*, 2001, **27**(11): 70—73.  
 [3] Cushman DW, Cheung H S. Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin I-Converting Enzyme of Rabbit Lung[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1971, **20**: 1637—1648.

# The Detection of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition by RP-HPLC Method

QU Yun-Bo LI Juan<sup>a</sup> PANG Si-Ping

(School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, P. R. China)

<sup>a</sup>(Lucheng Normal Middle School, Lucheng, Shanxi 030860, P. R. China)

**Abstract** The angiotensin-converting enzyme inhibition was analyzed by RP-HPLC. A linear relationship between the concentration of angiotensin-converting enzyme inhibitor solution and inhibition ratio under the experiment conditions was obtained, the correlation coefficient was 0.9936 with the average recovery of 98.6%—102.3% and the relative standard deviation of 2.63%. The method was simple, fast, accurate and sensitive.

**Key words** Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition, RP-HPLC.

